云 南 植 物 研 究 4(2):203—206, 1982
Acta Botanica Yunnanica

三分三愈伤组织细胞的悬浮培养

郑光植　何静波　王世林
（中国科学院昆明植物研究所）

CELL SUSPENSION CULTURE OF CALLUS FROM ANISODUS ACUTANGULUS ROOTS

Zheng Guangzhi, He Jingbo and Wang Shilin
(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica*)

为使药用植物组织培养应用于工业生产，通常的研究步骤之一是：诱导愈伤组织→愈伤组织培养→细胞悬浮培养→细胞深层培养。经由中间试验过渡到工业生产。我们已报道了三分三（*Anisodus acutangulus*）愈伤组织的诱导和培养[1,2,4]。现在报道三分三根愈伤组织细胞的悬浮培养。

材 料 和 方 法

将生长较好的，培养到第10至13代的根愈伤组织于培养皿内均匀的切成若干小堆，分别接种到盛有100毫升培养液的500毫升三角瓶中。放在26±1°C的恒温室中的摇床上振盪培养。余下的愈伤组织小堆，分别烤干称重，平均干重为接种量。一般一次试验重复三次，试验结束后，将悬浮细胞分别过滤，滤过细胞在60±1°C烤干称重。培养液仍为稍加改良的LS培养基[1,5]。培养物中莨菪碱及东莨菪碱的含量测定方法同前[1,2]。

结 果 与 讨 论

1.愈伤组织的年龄和接种量对细胞悬浮培养的影响

如图1所示，对于悬浮细胞的干重增加和生长速度来说，愈伤组织的年龄越年轻越好。虽然以10天年龄的愈伤组织为“种子”最好(图1)，但我们早期的工作表明[1]，培养两週的愈伤组织只有57.4毫克干重/瓶，而培养三和四週的愈伤组织分别可达147.7和312.7毫克干重/瓶。在细胞培养中（图1），以20天及30天年龄的愈伤组织为“种子”，其生长速度分别为261.6及195.6毫克干重/天/升，只分别比以10天的愈伤组织为

本文于1981年5月9日收到。

"种子"的少33及99毫克干重/天/升。因此以20—30天的愈伤组织作为细胞悬浮培养的"种子"最经济。

图2表明，悬浮细胞的干重增加和生长速度随接种量的增加而增加。虽然接种量为352毫克干重/100毫升时最好，也和愈伤组织的年龄的情况一样，若以此接种量做细胞悬浮培养，所需的愈伤组织瓶数太多，不经济。在未来的工业生产中是成吨的培养液，若以此接种量是根本行不通的。同理，以100—200毫克干重/100毫升的接种量较好。

2.培养方式和转速对细胞悬浮培养的影响

为了进行植物细胞悬浮培养，已设计了许多装置[6,7,9]。但除通气搅拌的发酵培养外，归纳起来不外往复式、旋转式和慢速转床三种类型。对三分三细胞悬浮培养来说，以旋转式摇床为好（表1）。

表1.不同培养方式对三分三悬浮培养细胞生长的影响

培养方式	干重增加（毫克）	生长速度（毫克干重/天/升）
往复式摇床	230.0	165.0
旋转式摇床	393.0	280.8
慢速转床	193.0	138.5

旋转式摇床的转速对细胞悬浮培养也有明显的影响。如图3所示，三分三悬浮细胞的干重增加和生长速度都随转速的增加而增加。即使转速只增加10转/分钟（即由150—160转/分钟），其生长也看出有增加（图3）。转速为0（液体静态培养）时，生长速度仅48.7毫克干重/天/升（图3），不可取。

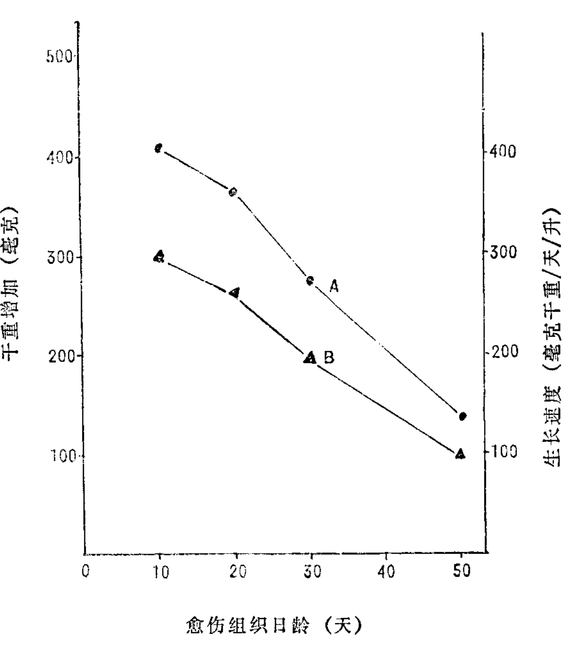


图1 不同年龄的三分三愈伤组织对细胞悬浮培养的影响
A．干重增加；B．生长速度。

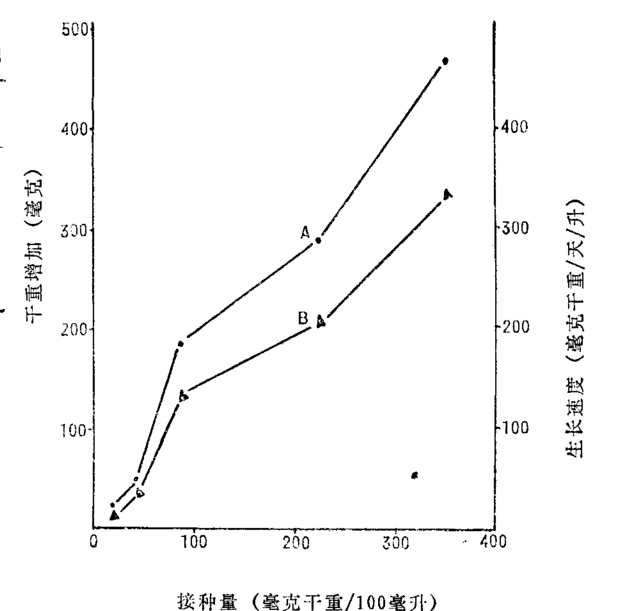


图2 三分三愈伤组织的不同接种量对细胞悬浮培养的影响
A．干重增加；B．生长速度。

3.悬浮细胞的生长和药用产物的时间进程

图 4 表明，悬浮细胞的干重增加和生长速度起初都随培养週数的增加而增加，在培养的第四周达到最高，随后又下降。但培养细胞的生长速度与干重增加稍有不同，生长速度的增加在三周后明显减慢（图 4）。培养期间 pH 值的变化与细胞的生长正相反，随培养时间的延长而下降（图 4）。有趣的是，悬浮细胞的生长速度尚未明显增加（刚接种一周之内）时，pH 值已明显下降；悬浮细胞的生长速度明显减慢（培养的第四周）之前，pH 值的下降暂时停止（培养的第三周）。表明 pH 值的下降先于细胞生长的增加而出现。pH 值的变化可能作为预测培养的适宜收获期的指标。

最适的收获期不仅要根据培养细胞的生长速度，还要根据细胞的药用成分含量来决定。图 5 表明莨菪碱和东莨菪碱的含量，以培养的第三周为最高。培养三周以后含量又急剧下降。综合培养细胞的生长速度和药物含量两个指标，以培养三周也就是在 pH 值不再下降（图 4，图 5）的时候，为最适的收获期。

Tabata，1977年[8] 曾把细胞培养的产物——生长模型分为三个主要类型。我们三分三细胞培养的产物——生长模型（图 4，图 5）类似于第一种类型，即产物的形成的进程几乎与细胞生长平行，但我们的产物形成提前于细胞生长。

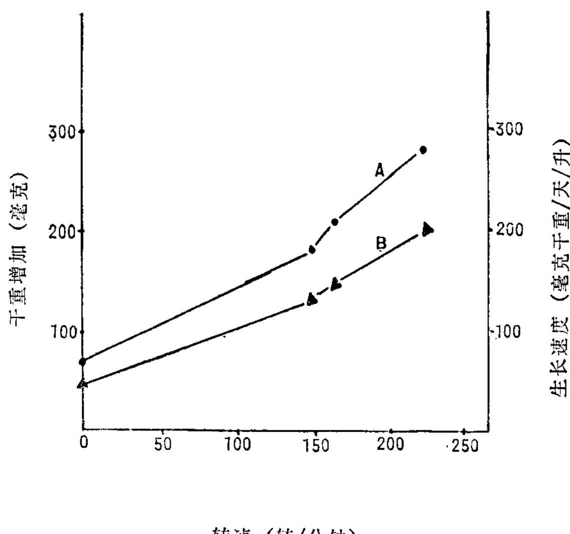


图 3　旋转式摇床的转速对三分三细胞悬浮培养的影响
A．干重增加；B．生长速度

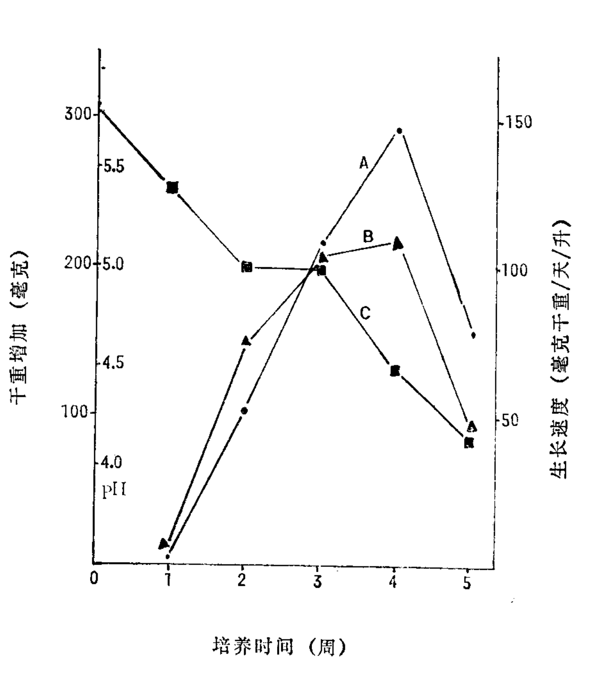


图 4　悬浮培养细胞生长的时间进程
A．干重增加；B．生长速度；C．pH。

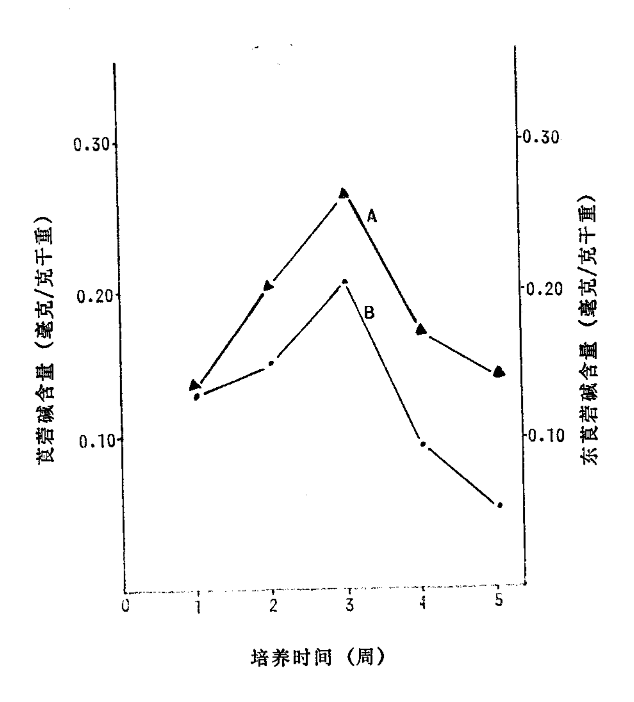


图5 药用产物的时间进程

A．东莨菪碱含量；B．莨菪碱含量。

参 考 文 献

〔1〕 郑光植、梁峥，1976：植物学报，18(2)：163—169。

〔2〕 郑光植、梁峥，1977：植物学报，19(3)：209—215。

〔3〕 郑光植等，1980：植物生理学报，6(4)：377—385。

〔4〕 Cheng Kuan-chih and Liang Cheng, 1978: In Proceedings of Symposium on Plant Tissue Gulture, P. 469—479. Science Press, Peking.

〔5〕 Linsmair, E. H. and Skoog, F., 1965: Physiol. Plant, 18: 100—127.

〔6〕 Street, H. E. 1977: Plant Tissue and Cell Culture, (Second Edition) P. 61—102, Blackwell Scientific, London.

〔7〕 Steward, F. C. et al., 1952: Ann. Bot. 16: 58—77.

〔8〕 Tabata, M., 1977: In W. Barz. et al., Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application. P. 3—6 Spring-Verlag, Berlina.

〔9〕 Tulecke, W., Nickell, G., 1959: Science, 130: 863—864.